

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 44 35 919 C 1

21 Aktenzeichen: P 44 35 919.5-41
22 Anmeldetag: 7. 10. 94
43 Offenlegungstag: —
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 7. 12. 95

51 Int. Cl. 6:
C 12 N 15/63
C 12 N 15/70
C 12 N 15/79
C 12 N 15/11
C 12 N 1/00
C 12 N 5/10
C 07 K 14/435
G 01 N 33/68

DE 44 35 919 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

74 Vertreter:
Müller-Boré & Partner, 81671 München

72 Erfinder:
Schwarz, Elisabeth, Dr., 69120 Heidelberg, DE;
Reuter, Marie-Stella, 69493 Hirschberg, DE;
Bartelmann, Matthias, 69198 Schriesheim, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
Cell 64, S. 235-248, 1991;

34 Zinkfinger-DNA, -Protein und ihre Verwendung

57 Die Erfindung betrifft eine für ein Zinkfinger-Protein
codierende DNA und ein solches Protein. Ferner betrifft die
Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins.

DE 44 35 919 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine für ein Zinkfinger-Protein codierende DNA und ein solches Protein. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins.

Die Umwandlung von normalen Zellen in Tumorzellen vollzieht sich in mehreren Teilschritten, bei denen es zu Veränderungen zellulärer Gene oder zum Erwerb viraler Onkogene kommt. Veränderungen zellulärer Gene umfassen die Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Mutation, Genamplifikation, Überexpression oder Chromosomen-Translokationen sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutation oder Deletion.

Verschiedene Gene, deren Veränderungen bei der Tumorentstehung von Bedeutung sind, konnten bislang identifiziert werden (vgl. Übersichtsartikel: Bishop, J. M., Cell 64 (1991), 235—248). Die Produkte solcher Gene haben verschiedene Funktionen. Sie wirken z. B. als Transkriptionsregulatoren, als Glieder unterschiedlicher Signaltransduktionsketten, wie Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren oder Proteinkinasen, bzw. als Aktivatoren oder Inhibitoren der Zellteilung.

Beispiele von Transkriptionsregulatoren sind Zinkfinger-Proteine. Diese Proteine besitzen charakteristische, zwei Cystein- und zwei Histidinreste enthaltende Strukturen, die so zueinander positioniert sind, daß sie ein Zinkatom binden. Zinkfinger-Proteine sind DNA-bindende Proteine. Ein Beispiel für Zinkfinger-Proteine ist das Produkt des Wilms-Tumorsuppressorgens WT1, dessen Verlust bei der Entstehung von Wilms-Nierentumoren eine wesentliche Rolle spielt.

Bis heute sind noch nicht alle an Tumorentstehung und -wachstum beteiligten Gene bzw. Genprodukte bekannt. Eine Tumordiagnose bzw. -therapie ist daher bisher nur begrenzt möglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Tumordiagnose bzw. -therapie umfassender betrieben werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine für ein Zinkfinger-Protein codierende DNA, die umfaßt:

- (a) die DNA der Nukleotide 446—1476 von Fig. 1 oder einen Teil davon,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Fig. 1 zeigt das Insert des cDNA Klon COS AP4-E1. Dieser Klon entstammt einer cDNA-Bibliothek der Cervixcarcinomzelllinie ME 180 (vgl. Reuter, M. S. et al, J. Virol. 65 (1991), 5564—5568). Diese Zelllinie enthält die Human Papillomvirus 68-DNA (HPV 68-DNA) stabil integriert. Der Klon COS AP4-E1 enthält zwischen den Nukleotiden 1—21 HPV 68-DNA. Ferner enthält er zwischen den Nukleotiden 22—1476 zelluläre Sequenzen, wobei diese zwischen den Nukleotiden 446—1476 Exon-Sequenzen eines Zinkfinger-Gens sind. Die Exon-Sequenzen codieren für 4 Zinkfinger: Zinkfinger

1 : 1130—1191, Zinkfinger 2 : 1214—1275, Zinkfinger 3 : 1298—1360, Zinkfinger 4 : 1382—1432. Der Klon COS AP4-E1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen unter DSM 9450 am 30. September 1994 hinterlegt.

Vorstehende Insert-DNA, insbesondere zwischen den Nukleotiden 446—1476, kann Teil einer für ein vollständiges Zinkfinger-Protein codierenden DNA sein. Eine solche DNA und das durch sie codierte Zinkfinger-Protein sind somit auch Gegenstand der Erfindung.

Die Bereitstellung einer für vorstehendes Zinkfinger-Protein codierenden DNA erfolgt in üblicher Weise. Beispielhaft wird die Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere die DNA zwischen den Nukleotiden 446—1476, als Sonde zur Hybridisierung einer allgemein erhältlichen cDNA-Bibliothek aus Leber, Gehirn, Plazenta oder Muskel, vorzugsweise Leber, verwendet. Auch kann eine cDNA-Bibliothek aus Blutzellen oder HeLa-Zellen verwendet werden. Die genannten Gewebe und Zellen enthalten ausreichend RNA-Transkripte, die mit der Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere der DNA zwischen den Nukleotiden 446—1476 hybridisieren (vgl. Fig. 2). Erhaltene Klone werden einer Sequenzierung unterzogen und ausgehend von der Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere der DNA zwischen den Nukleotiden 446—1476, wird die ein vorstehendes Zinkfinger-Protein codierende DNA bestimmt.

Des weiteren eignet sich die Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere die DNA zwischen den Nukleotiden 446—1476, und ganz besonders die DNA zwischen den Nukleotiden 1240—1476, zur Identifizierung einer genomischen für vorstehendes Zinkfinger-Protein codierenden DNA. Hierzu wird die entsprechende DNA von COS AP4-E1, z. B. die DNA zwischen den Nukleotiden 1240—1476, als Sonde zur Hybridisierung einer genomischen DNA-Bibliothek verwendet. Eine solche kann aus den vorstehend genannten Geweben und Zellen erstellt sein.

Erfindungsgemäß wird der Klon COS 1 APM erhalten. Seine Insert-DNA enthält in einem 5,5 kb großen SacI-Fragment die zur verwendeten Sonde, z. B. der DNA zwischen den Nukleotiden 1240—1476, entsprechende DNA. In den Fig. 3 und 4 ist diese DNA von COS 1 APM zwischen den Nukleotiden 256—492 präsentiert. Der Klon COS 1 APM wurde bei der DSM unter DSM 9462 am 07. 10. 1994 hinterlegt. Gegenstand der Erfindung ist somit auch eine genomische, das vorstehende Zinkfinger-Protein codierende DNA sowie das durch sie codierte Protein.

Erfindungsgemäß kann vorstehende für das Zinkfinger-Protein codierende DNA in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z. B. pGE-MEX, pUC-Derivate und pGEX-2T. Für die Expression in Hefe sind z. B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z. B. pKCR, pEF-BOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um vorstehende, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E. coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101 und JM109, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, und HeLa. Der Fachmann weiß, in welcher Weise vorstehende DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß vorstehende cDNA in E. coli, Hefe oder tierischen Zellen exprimiert werden kann, während vorstehende genom-

ische DNA nur in tierischen Zellen zu exprimieren ist. Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfigierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das exprimierte Zinkfinger-Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein vorstehendes, rekombinant hergestelltes Zinkfinger-Protein ist somit auch Gegenstand der Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Zinkfinger-Protein gerichteter Antikörper. Die Herstellung eines solchen erfolgt in üblicher Weise. Beispielsweise wird hierzu das Zinkfinger-Protein in BALB/c-Mäuse subcutan injiziert. Diese Injektion wird im Abstand von jeweils 3 Wochen wiederholt. Etwa 2 Wochen nach der letzten Injektion wird das den Antikörper enthaltende Serum isoliert und in üblicher Weise getestet.

In bevorzugter Ausführungsform ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Zu seiner Herstellung werden nach vorstehender vierten Injektion den Mäusen Milzzellen entnommen und diese in üblicher Weise mit Myelomzellen fusioniert. Die weitere Klonierung erfolgt ebenso nach bekannten Verfahren.

Die vorliegende Erfindung stellt eine bisher nicht gekannte Zinkfinger-DNA sowie ein durch sie codiertes Zinkfinger-Protein bereit. Die erfindungsgemäße DNA eignet sich als Sonde für diagnostische Zwecke. Darüberhinaus kann sie in einem dem Fachmann bekannten Expressionsvektor zur Gentherapie eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Protein eignet sich ebenfalls für therapeutische Zwecke. Hierzu kann es in einer üblichen pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht werden.

Des weiteren stellt die vorliegende Erfindung gegen das vorstehende Protein gerichtete Antikörper bereit. Diese eignen sich bestens zu diagnostischen Zwecken.

Somit liefert die vorliegende Erfindung neue Mittel zur Diagnose und Therapie von mit der erfindungsgemäßen DNA und dem durch sie codierten Protein zusammenhängenden Erkrankungen, insbesondere von Tumorerkrankungen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Insert-cDNA des Klon COS AP4-E1,

Fig. 2 zeigt die Hybridisierung von PolyA⁺-RNA aus verschiedenen Zellen mit der DNA zwischen den Nukleotiden 1240—1476 von COS AP4-E1,

Fig. 3 zeigt eine Teilsequenz der genomischen Insert-DNA des Klon COS 1 APM, und

Fig. 4 zeigt den Vergleich der DNA zwischen den Nukleotiden 1240—1476 von Klon COS AP4-E1 und der DNA zwischen den Nukleotiden 256-492 von Klon COS 1 APM.

Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel erläutert.

Beispiel

Herstellung einer erfindungsgemäßen Zinkfinger-DNA

Eine aus HeLa-Zellen erstellte λ cDNA-Bibliothek wird einem üblichen Hybridisierungsverfahren unterzogen. Hierzu werden die durch Infektion der Bakterien erhaltenen Phagenplaques mit dem ³²p-markierten DNA-Insert des Klon COS AP4-E1, insbesondere der DNA zwischen den Nukleotiden 1240—1476 (vgl. Fig. 1), inkubiert. Es wird eine Hybridisierung mit einzelnen Phagenplaques erhalten. Aus diesen wird die Phagen-DNA isoliert und mit EcoRI gespalten. Die erhaltenen Fragmente werden in einem 0,5%igen Agaro-

segel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarosegel wird einem üblichen Blotting-Verfahren unterzogen, wodurch die DNA aus dem Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wird. Diese wird in ein Hybridisierungsverfahren eingesetzt, in dem die entsprechende DNA des DNA-Inserts von Klon COS AP4-E1 als ³²p-markierte Probe verwendet wird. Es wird eine Hybridisierung mit einzelnen DNA-Fragmenten erhalten. Diese werden isoliert und in einem mit EcoRI gespaltenen, dephosphorylierten Plasmidvektor, z. B. pBluescript, kloniert. Einzelne Klone werden analysiert, und durch Restriktionsspaltungen sowie Sequenzierung wird ein erfindungsgemäße Zinkfinger-DNA enthaltender Klon identifiziert.

Patentansprüche

1. DNA, codierend für ein Zinkfinger-Protein, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA der Nukleotide 446—1476 von Fig. 1, wobei diese DNA von Fig. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist, oder einen Teil davon,
 - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
2. DNA nach Anspruch 1, nämlich die DNA der Nukleotide 256—492 von Fig. 3, wobei diese DNA von Fig. 3 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
3. Protein, codiert durch die DNA nach Anspruch 1 oder 2.
4. Expressionsvektor, umfassend eine für das Protein nach Anspruch 3 codierende DNA.
5. Transformante, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 4.
6. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 3, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 5 unter geeigneten Bedingungen.
7. Verwendung der DNA nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 3 als Reagens zur Therapie.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

FIG. 1 cDNA-Insert des Klons COS A74-E1

```

      10          30          50
1  ctgcaatggccaattgtgaagggctctggtgagaacatggccaatgacattgatgagct
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   gacgttaccgggtaaacacttcccagagaccgactcttgtagcgggtactgtaactactcga
                                     60

      70          90          110
61 cattggcattcccttccccaaccacagcagtgaggtcctgtgcagcctcaatgagcaacg
   -----+-----+-----+-----+-----+
   gtaaccgtaaggggaaggggttggtgtcgtcactccaggacacgtcggagttactcgtttgc
                                     120

     130          150          170
121 gcacgatggcctgctgtgtgacgtgctcctgggtggcaggagcaggagtatcggaccca
   -----+-----+-----+-----+-----+
   cgtgctaccggagacacactgcacgaggaccaccacgtcctcgtcctcatagcctgggt
                                     180

     190          210          230
181 ccgctccgtcctggctgctgCaGcAagtacttcaagaagcttttcacagccggcaccct
   -----+-----+-----+-----+-----+
   ggcgaggcaggaccgacggacGtCgTtcatgaagttcttcgaaaagtgtcggccgtggga
                                     240

     250          270          290
241 agccagccagccctacgtctatgagatcgactttgtccacctgaGgctctggtgctatc
   -----+-----+-----+-----+-----+
   tcggtcgggtcgggatgcagatactctagctgaaacaggtggactCcagagaccgacgatag
                                     300

     310          330          350
301 ctggagttcgcctacacctccacGctcaccatcacgctggcaatgtcaagcacatcctc
   -----+-----+-----+-----+-----+
   gacctcaagcggatgtggaggtgCgagtggttagtggcgaccggttacagttcgtgtaggag
                                     360

     370          390          410
361 aacgCagccaggatgctggagatccagtgcacGtgaaacgtgtgcctggagatcatggag
   -----+-----+-----+-----+-----+
   ttgcGtcggtcctacgacctctaggtcacgtaGcacttgacacggacctctagtagctc
                                     420

     430          450          470
421 cctgggggggacgggggggaggaggatgacaaggaggacgatgacgacgacgaagatgat
   -----+-----+-----+-----+-----+
   ggacccccccctgccccccctcctcctactgttctcctcctgctactgctgctgttctacta
                                     480
                                     M T R R T M T T T K M M

     490          510          530
481 gatgatgaggaggacgaagaggaggaggagggaagaggaggaggatgacgatgatgacacg
   -----+-----+-----+-----+-----+
   ctactactcctcctgcttctcctcctcctcctcctcctcctcctactgctactactgtgc
                                     540
                                     M M R R T K R R R R K R R R M T M M T R

     550          570          590
   gaGGActttGctgaccaagaaaacttGcctgacccccaggacatcagctgccaccaaaagc

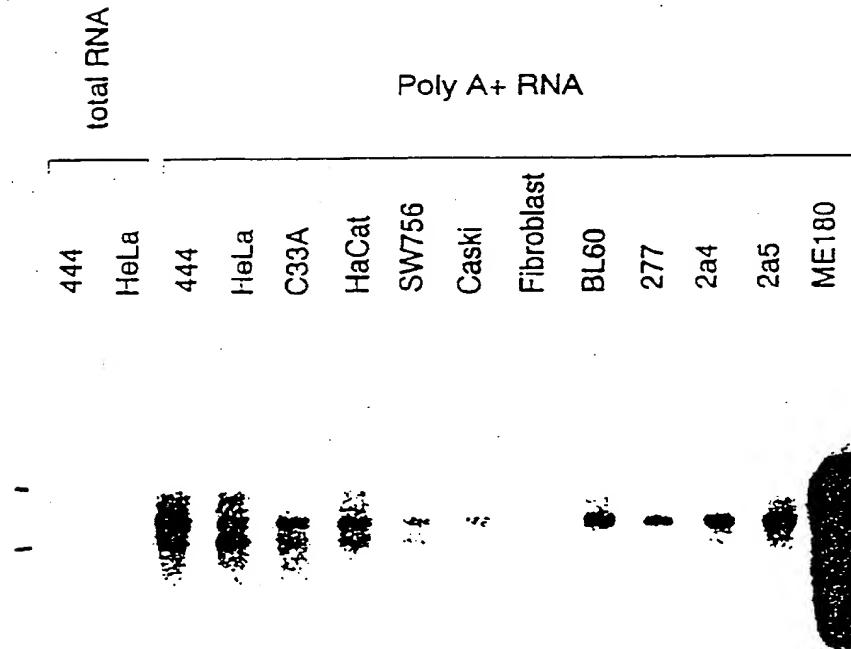
```

FIG. 1 (Fortsetzung I)

10

[illegible]

FIG. 2 Hybridisierung von PolyA⁺RNA aus verschiedenen Zellen mit der DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476 von COS AP4-E1



444: nicht tumorigene HeLa x Fibroblasten-Hybridzelllinie

HeLa: HPV18 positive Zervixkarzinomzelllinie

C33A: HPV-negative Zervixkarzinomzelllinie

HaCat: spontan transformierte Vorhaut-Keratinocyten-Zelllinie, HPV-negativ

SW756: HPV18-positive Zervixkarzinomzelllinie

Caski: HPV16-positive Zervixkarzinomzelllinie

Fibroblast: humane epitheliale Lungenfibroblasten

BL60: EBV-positive Burkitt's Lymphomzelllinie

277: spontan transformierte lymphoblastoide Zelllinie

2a4 und 2a5: nicht tumorigene BL60 x 277 Hybridzelllinie

FIG. 3 Teilsequenz der genomischen Insert-DNA des Klon
COS 1 APM

```

      10      30      50
1  GAGCTCGGGTATAAAAGGAGTTTGGGGGAGTGGGGCTTTCAGGACACTGCTTTTCCGCA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61 CTCGAGCCCATATTTTCCTCAAACCCCTCACCCGAAAGTCCTGTGACGAAAAAGGCGT
      70      90      110
61 TCCCTTTAATCCAGGTGAGTAACCATACTGTCTAAGGTGGGGCAGCAGTTGAGCGTAGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121 AGGGAATTAGGTCCACTCATTGGTATGGACAGATTCCACCCCGTCGTCAACTCCCATCT
      130      150      170
121 TCTAGCATGAGACCTATTTCTGGGGTTTGACTCCATGGCAGTAGGGAGCCTCGGCTGGTT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
181 AGATCGTACTCTGGATAAAGACCCCAAAGTACCGGTACCGTCATCCCTCGGAGCCGACCAA
      190      210      230
181 CTGGAGAAAGGGGAGCAAAAGGTAGGAATGGCTCCTGGTGTTCCTGCGGACTGACCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
241 GACCTCTTTCCCCCTCGTTTTCCAATCCTTACCGAGGACCACAAGGGACGCTGACTGGG
      250      270      290
241 CCAGTCTCTGCATTGCAGGCAGGACAAGCTGAAAATCCACATGCGGAAGCACACAGGGGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
301 GGTGAGAGACGTAACGTCCGTCTGTTGCACTTTTAGGTGTACGCCCTTCGTGTGTCCCTT
      310      330      350
301 GCGGCCCTACCTGTGCATCCACTGCAACGCCAAGTTTCGTGCACAACTACGACCTCAAGAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
361 CGCCGGGATGGACACGTAGGTGACGTTGCGGTTCAAGCACGTGTGATGCTGGAGTTCTT
      370      390      410
361 CCACATGCGCATCCACACGGGCGTGCGGCCCTACCAAGTGGAGTTCTGCTACAAGAGCTT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
421 GGTGTACGCGTAGGTGTGCCCCGACGCCGGGATGGTCACGCTCAAGACGATGTTCTCGAA
      430      450      470
421 CACGCGCTCTGACCACTGCACCGCCACATCAAGCGCCAGAGCTGCCGATGGCACGCCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
481 GTGCGCGAGACTGGTGGACGTGGCGGTGTAGTTTCGCGGTCTCGACGGCGTACCGTGCGGG
      490
481 CGACGCGGCCGC
   -----+-----+-----+
      492
      GCTGCGCCGGCG

```

FIG. 4 Vergleich der DNA zwischen den Nukleotiden
1240-1476 von Klon COS AP4-E1 und der DNA
zwischen den Nukleotiden 256-492 von Klon
COS 1 APM

```
256 CAGGCAGGACAAGCTGAAAATCCACATGCGGAAGCACACAGGGGAGCGGC 305
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1240 caggcaggacaagctgaaaatccacatgcggaagcacacaggggagcggc 1289

306 CCTACCTGTGCATCCACTGCAACGCCAAGTTCGTGCACAACCTACGACCTC 355
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1290 cctacctgtgcatccactgcaacgcCaagttcgtgcacaactacgacctc 1339

356 AAGAACCACATGCGCATCCACACGGGCGTGCGGCCCTACCAGTGCGAGTT 405
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1340 aagaaccacatgcgcatccacacgggcggtgcggccctaccagtgcgagtt 1389

406 CTGCTACAAGAGCTTCACGCGCTCTGACCACCTGCACCGCCACATCAAGC 455
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1390 ctgctacaagagcttcacgcgctctgaccacctgcaccgccacatcaagc 1439

456 GCCAGAGCTGCCGCATGGCACGCCCCGACGCGGCCGC 492
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1440 gccagagctgccgcatggcacgccccgacgcggccgc 1476
```